植 物 分 类 与 资 源 学 报　2012, **34** (1): 56~62
Plant Diversity and Resources　DOI: 10.3724/SP.J.1143.2012.11057

云南悬钩子蔷薇 NBS-LRR 类抗病基因同源克隆与分析*

陈　玲[1,2], 张　颢[1], 邱显钦[1], 晏慧君[1],
王其刚[1], 蹇洪英[1], 唐开学[1**]
(1 云南省农业科学院花卉研究所花卉育种重点实验室, 云南 昆明　650205;
2 云南大学生命科学学院, 云南 昆明　650091)

摘要: 为研究云南野生蔷薇属中的 NBS 类抗病基因, 根据已知抗病基因 NBS-LRR 序列中的保守区域设计简并引物, 利用 RT-PCR 技术从云南悬钩子蔷薇中进行体外扩增, 获得了对应区域的 cDNA 片段, 回收、克隆这些特异片段, 测序分析, 共得到 4 个含有 NBS-LRR 保守结构域的抗病基因同源序列 (RGAs), 分别命名为 AC9、AC39、AC50 和 AC68。它们与已报道的 11 个 NBS 类抗病基因相应区段的氨基酸序列相似性为 5.4%~79.2%, 其中这 4 个 RGAs 片段与 *Mi*、*RPS2*、*Pib* 和 *RPM1* 基因聚为一类。表明这 4 条 RGAs 序列可进一步用作悬钩子蔷薇抗病候选基因的分子筛选及遗传图谱的构建。

关键词: 悬钩子蔷薇; 保守区域; 抗病基因同源序列; 简并引物
中图分类号: Q 78　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 2095-0845(2012)01-056-07

Cloning and Analysis of NBS-LRR Type Disease Resistance Gene Analogs from *Rosa rubus* in Yunnan

CHEN Ling[1,2], ZHANG Hao[1], QIU Xian-Qin[1], YAN Hui-Jun[1],
WANG Qi-Gang[1], JIAN Hong-Ying[1], TANG Kai-Xue[1**]
(1 *Flower Research Institut-Flower Breeding Key Labe*, *Yunnan of Agricultural Sciences*, Kunming 650205, China;
2 *College of Life Sciences*, *Yunnan University*, Kunming 650091, China)

Abstract: In the study of NBS resistance genes of Yunnan wild *Rosa*, the degenerate oligonucleotide primers were designed according to the conserved motifs NBS-LRR of most plant resistance (*R*) genes. The cDNA fragments were isolated from *Rosa rubus* by reverse transcription PCR (RT-PCR). Then four resistance gene analogs (RGAs) were sequenced and named as AC9, AC39, AC50 and AC68, which contain NBS-LRR domain. The sequence of each RGAs was compared with NBS region of eleven resistance genes reported before, and the similarities of amino-acid sequences ranged from 5.4% to 79.2%, and these four RGAs were clustered a group with *Mi*、*RPS2*、*Pib* and *RPM1* gene. These results showed that the four RGAs will be used as molecular markers for screening candidate disease resistance genes and genetic map construction of *Rosa rubus* in the future.

Key words: *Rosa rubus*; Conserved motif; Resistance gene analogs (RGAs); Degenerate oligonucleotide primers

植物抗病基因 (plant disease resistance genes, 简称 *R* 基因) 的克隆对于培育抗病植物及研究病原物与寄主之间互作的分子机制等具有重要意义。*R* 基因主要通过转座子标签技术和图位克隆

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160403); 云南省应用基础研究计划项目 (2011FB124); 科技部 863 项目 (2011AA100208); 云南省攻关项目 (2011BB013); 农业部 948 项目 (2011-G17)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: kxtang@hotmail.com; Tel: 0871-5120870
收稿日期: 2011-04-02, 2011-09-23 接受发表
作者简介: 陈　玲 (1986-) 女, 汉族, 在读硕士, 主要从事花卉育种相关研究。E-mail: liushui_2008@yahoo.com.cn

技术获得，这两种技术适用于基因组较小的植物，但对于基因组复杂的植物则相当困难（高丽华等，2007），因而寻求新的克隆技术是必要的。研究发现 *R* 基因在结构上具有相当的保守性，根据 *R* 基因保守结构域的特征，可将 *R* 基因分为 4 大类（玉米抗圆斑病基因 *Hm1* 和大麦抗白粉病基因 *Mlo* 例外）（Hammond-Kosack 和 Jone，1997），其中 NBS-LRR 是最主要的一类，占所有已克隆 *R* 基因的 75% 左右（Hulbert 等，2001），该结构域能够结合 ATP 或 GTP，在植物抗病反应中起重要作用（Ellis 和 Jones，1998）。*R* 基因的保守性使得同源克隆技术成为可能（Speulman 等，1998），即根据 *R* 基因保守序列设计简并引物来扩增基因组 DNA 或 cDNA，从中获得 *R* 基因同源序列（Resistance gene analogues，RGAs），通过染色体定位或明确它们与已知 *R* 基因位点的连锁关系，达到筛选 *R* 基因或抗病相关基因的目的。这就是近年兴起的基于同源性的克隆技术（homology-based cloning），该方法已成为当前克隆 *R* 基因较流行的策略之一（刘宇等，2010）。

随着基因工程技术的发展，人们已能够将多种抗植物病虫害的基因转入目的植物中，这使得发掘植物自身的 *R* 基因资源显得越来越重要。野生蔷薇由于长期处于野生状态，经受了各种灾害和不良环境的自然选择，抗逆性较强，是天然的基因库，保持有栽培月季不具有或已经消失了的遗传基因，是克隆 *R* 基因极有价值的材料（白锦荣，2009）。云南省拥有全国一半以上的蔷薇属（*Rose* L.）野生资源，在生态和遗传水平上都有较高的多样性，具有抗病、抗逆、香型、连续开花等许多优良性状（白锦荣等，2009；唐开学等，2008）。悬钩子蔷薇（*Rosa rubus*）是云南野生蔷薇中优良的种质资源，色香俱美、耐旱、抗病虫，适应性强、分布区域较广，是垂直绿化的优良观赏花木，在月季育种中具有较大的潜在利用价值（张佐双和朱秀珍，2006）。近几十年来，关于蔷薇属抗病种质资源方面的研究已有报道（Byrne 和 Black，1996；张喜萍等，2002；刘永刚和刘青林，2004；李卉，2010），但对于悬钩子蔷薇的应用还只是停留在庭院观赏方面（张佐双和朱秀珍，2006；章银柯等，2009）。

本文根据已报道的 NBS-LRR 类 *R* 基因的保守区域 P-loop 和 GLPL，设计简并引物，采用 RT-PCR 技术，从悬钩子蔷薇 cDNA 中扩增和分离 RGAs。以期通过这些 RGAs 的克隆和序列分析，为进一步研究云南野生蔷薇的 *R* 基因资源和抗病机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　植物材料　供试材料为悬钩子蔷薇（*Rosa rubus*），采集于云南省农业科学院花卉研究所蔷薇种质资源圃。田间采取新鲜幼嫩叶片，用锡箔纸包裹之后立即投入液氮中带回实验室，-80℃冰箱保存。

1.1.2　引物设计　根据拟南芥（*Arabidopis thaliana*）抗丁香假单孢杆菌（*Pseudomonas syringae*）基因 *RPS2*、烟草（*Nicotina tabacum*）抗花叶病毒（*Tobacco mosaic virus*）基因 *N*、亚麻（*Linum usitatissimum*）抗锈病（*Melampsora lini*）基因 *L6* 等 NBS-LRR 类 *R* 基因的蛋白保守区域 P-loop 和 GLPL 设计简并引物（表 1）。

1.1.3　试剂与测序　RNA 提取试剂盒购自上海捷瑞生物技术有限公司；反转录酶和 PCR 产物回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；*Taq*DNA 聚合酶和 pMD18-T 载体连接试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司；引物合成由上海捷瑞生物技术有限公司合成；测序由上海杰李生物技术有限公司完成。

表 1　用于 PCR 扩增的简并引物

Table 1　Degenerate primers used for PCR amplification

引物 Primer	保守结构域 Conserved motif	引物序列 Sequence（5′→3′）
（正向引物）NBS1	GGV/IMGKTT	GGNGGNRTNGGNAARACNAC
（反向引物）NBS2	GL/FPL/FA/VL	AKWGCYARRGGDARYCC
（正向引物）APF	GGV/IMGKTT	GGWATGGGWGGWRTHGGWAARACHAC
（反向引物）APR	GL/FPL/FA/VL	ARNWYYTTVARDGCVARWGGVARWCC

注：N=A/T/C/G；M=A/C；W=A/T；S=C/G；Y=C/T；K=G/T；V=A/C/G；H=A/C/T；D=A/G/T；R=A/G

1.2 方法

1.2.1 *总 RNA 的提取* RNA 提取按照 RNA 提取试剂盒说明进行，提取的 RNA 经紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳进行浓度测定和质量检测。

1.2.2 *RT-PCR 扩增* 反转录第一链的合成按反转录试剂盒说明书进行。取 1～2 μL 反转录溶液作模板进行 RT-PCR 扩增，反应体系如下：10×PCRBuffer 2 μL；$MgCl_2$（25 mmol·L^{-1}）1.6 μL；dNTPs（2.5 mmol·L^{-1}）1.6 μL；引物（10 μmol·L^{-1}），各 1 μL；*Taq*DNA 聚合酶（5 U·μL^{-1}）0.1 μL；用 ddH_2O 补足至 20 μL。扩增条件：94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，30 个循环，最后 72℃延伸 10 min。在实验过程中，同时以 ddH_2O 为模板，其它反应成分和反应条件均相同，作为阴性对照，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 *PCR 产物克隆及测序* PCR 产物凝胶电泳之后，切下目的片段，使用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物，回收片段连接到 pMD18-T 载体上，转化到大肠杆菌 DH5α 中，进行蓝白斑筛选，挑取阳性单菌落（白斑），接种于 LB 液体培养基中，并用相应引物（本研究的两对简并引物）PCR 鉴定后，选取有插入片段的阳性克隆送公司测序。

1.2.4 *序列分析* 测序获得的序列在 GenBank 中进行同源性检索，结合 BioXM2.6 查找开放阅读框（ORF）并翻译成氨基酸序列，结构域分析采用 SMART，氨基酸序列多重比对采用 DNAStar 和 DNAMAN。用于参比的 *R* 基因有：拟南芥 *RPS2*（AAA21874）、*RPS5*（AAC26125）和 *RPP8*（AAC83165），烟草 *N*（AAA50763），亚麻 *L6*（AAA91022），芥蓝头（*Arabidopsis lyrata*）*RPM1*（AAD41050），莴苣（*Lactuca sativa*）*Dm3*（AAP42998），番茄（*Lycopersicon esculentum*）*I2C*（AAB63274）和 *Mi*（AAC97933）及水稻（*Oryza sativa*）*Xa-1*（BAA25068）和 *Pib*（BAA76281），其中 *N* 和 *L6* 基因为 TIR-NBS-LRR 类，其余基因为 non-TIR-NBS-LRR 类。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取

提取的 DNA 经紫外分光光度计检测浓度为 0.4 μg·μL^{-1}，且 OD260/OD280 比值为 1.85，表明总 RNA 的纯度较高，经琼脂糖凝胶电泳检测（图 1），结果表明，提取的总 RNA 质量良好，无 DNA 污染，也没有发生降解，可以满足后续实验操作。

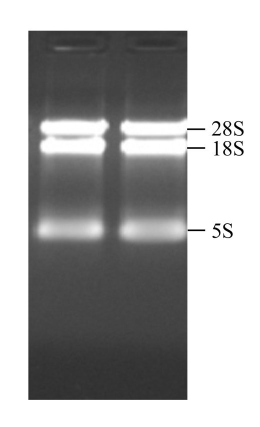


图 1 悬钩子蔷薇总 RNA 的提取

Fig. 1 Total RNA extracted from *Rosa rubus*

2.2 悬钩子蔷薇 RGAs 的分离与鉴定

利用引物对 NBS1+NBS2 和 APF+APR 进行 RT-PCR 扩增。从图 2 中可见，两对引物都扩增出单一清晰的条带。对扩增产物进行回收、克隆，多次测序得到 56 条序列，经鉴定得到 NBS 序列 20 条，获得的序列中有 4 条具有连续的开放阅读框（ORF），分别命名为 AC9、AC39、AC50 和 AC68。其余 16 条序列都含有不少于 1 个的终止密码子，不能通读，因此这 16 条序列不再进行下一步分析。

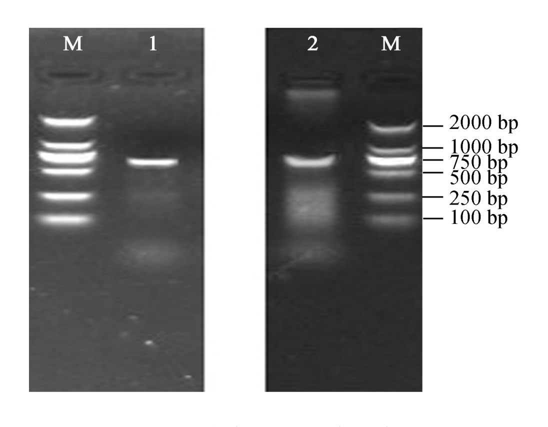


图 2 两对简并引物 PCR 扩增产物

M：2000 DNA marker；1：APF+APR 引物组合；2：NBS1+NBS2 引物组合

Fig. 2 Electrophoretogram of PCR amplification using two degenerate primers APF+APR and NBS1+NBS2

M：2000 DNA marker；1：APF+APR primer combination；2：NBS1+NBS2 primer combination

2.3 悬钩子蔷薇 RGAs 保守结构域分析

利用 DNAMAN 将 4 条序列进行多重序列比对分析（图 3），结果发现，4 条序列都具有 NBS

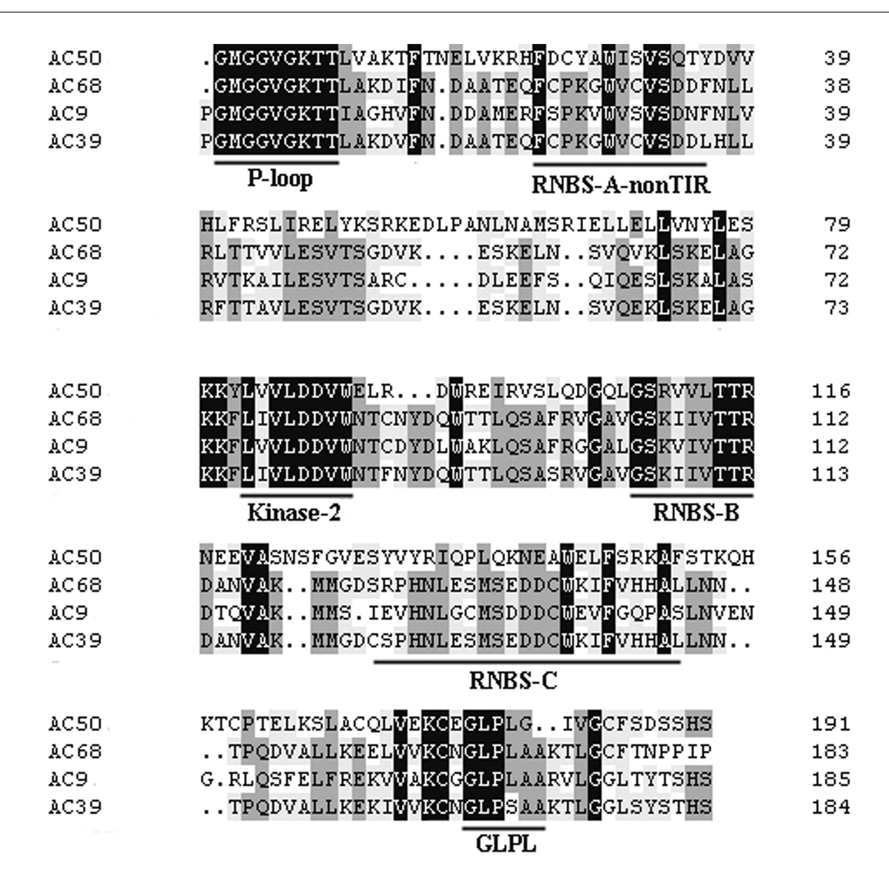


图 3　悬钩子蔷薇 RGAs 氨基酸序列比对分析（最下方的横线表示该区域为 RGAs 共同的保守结构域）

Fig. 3　Multiple amino acid sequence alignment in *Rosa rubus* RGAs (The mutual domains were denoted by the line below)

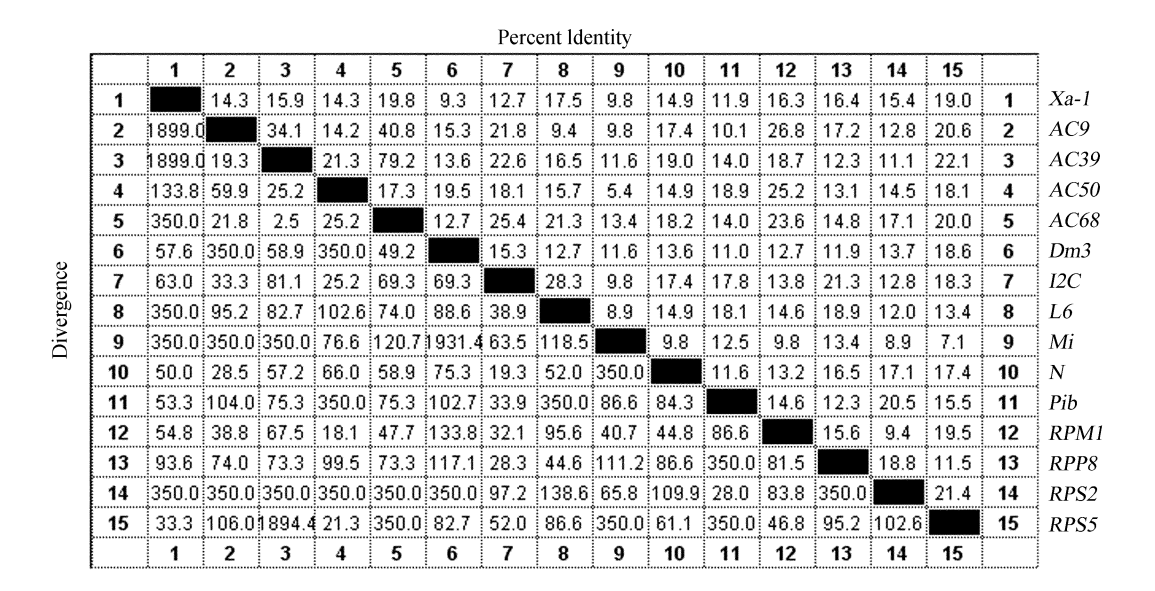
类 *R* 基因的 4 个保守基序，即“P-loop”、“Kinase-2a”、“Kinase-3a”3 个模体和“GLPL”区（William, 1999），并且具有 Meyers 等（1999）所定义的 RNBS-A-nonTIR（FnLxAWVCvSQxF）、B（GSRIIITTRD）、C（YEVxxLSDEEAWELFCKxAF）3 个模体，指示悬钩子蔷薇的 4 条 RGAs 序列都为 non-TIR-NBS-LRR（CC-NBS-LRR）类。

2.4　悬钩子蔷薇 RGAs 核苷酸相似性搜索

使用 Blastn 进行相似性搜索，未发现有与之完全相同的序列，但发现该 4 条序列与栽培月季和刺梨的 RGAs 有着 90% 以上的相似性，与其它物种的 RGAs（如毛果杨、葡萄）相似性也较高，在 85% ~98% 之间。并且发现 AC9 与高山栎抗疫病基因 *RPc*（GU289638）相似性为 68%，与芭蕉抗镰刀菌枯萎病基因 *BR*（EU123875）相似性为 81%，AC39 与马铃薯抗晚疫病基因 *R3a-like*（AAW48299）相似性为 83%，AC68 与马铃薯抗晚疫病基因 *R3a*（AAW48299）相似性为 95%，AC50 与蔷薇科李属植物（如樱桃、甘肃桃等）的部分 RPM 家族基因（如 *RPM1*、*RPM2*、*RPM3* 等）相似性在 73% ~75% 之间。

2.5　RGA 氨基酸与已知 *R* 基因的比较与聚类分析

应用 DNAStar 将悬钩子蔷薇的 4 条 RGAs 氨基酸序列与已知 *R* 基因 *RPS2*、*RPS5*、*RPP8*、*Xa-1*、*Pib*、*N*、*L6*、*RPM1*、*Dm3*、*Mi*、*I2C* 的 NBS 区域氨基酸序列进行相似性比较分析（图 4），结果显示，这些悬钩子蔷薇的 RGAs 与已知 *R* 基因相应区域的氨基酸序列相似性在 5.4% ~79.2% 之间，相对于 4 条序列而言，AC39 与 AC68 之间相似性最高为 79.2%，AC9 与 AC50 之间相似性最低为 14.2%；4 条序列与其它已知序列相似性都很低，AC9 与 *RPM1* 相似性最高，但也只有 26.8%。进一步进行聚类分析发现（图 5），4 条 RGAs 片段聚为一类，与 *Mi*、*RPS2*、*Pib* 和 *RPM1* 聚为一大类，其中 *Mi*、*RPS2*、*Pib* 和 *RPM1* 为 non-TIR-NBS-LRR 类 *R* 基因，说明 4 条序列为 non-TIR-NBS-LRR 类，与前面多重序列比较结果相一致。



Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
1		14.3	15.9	14.3	19.8	9.3	12.7	17.5	9.8	14.9	11.9	16.3	16.4	15.4	19.0	1	*Xa-1*
2	1899.0		34.1	14.2	40.8	15.3	21.8	9.4	9.8	17.4	10.1	26.8	17.2	12.8	20.6	2	*AC9*
3	1899.0	19.3		21.3	79.2	13.6	22.6	16.5	11.6	19.0	14.0	18.7	12.3	11.1	22.1	3	*AC39*
4	133.8	59.9	25.2		17.3	19.5	18.1	15.7	5.4	14.9	18.9	25.2	13.1	14.5	18.1	4	*AC50*
5	350.0	21.8	2.5	25.2		12.7	25.4	21.3	13.4	18.2	14.0	23.6	14.8	17.1	20.0	5	*AC68*
6	57.6	350.0	58.9	350.0	49.2		15.3	12.7	11.6	13.6	11.0	12.7	11.9	13.7	18.6	6	*Dm3*
7	63.0	33.3	81.1	25.2	69.3	69.3		28.3	9.8	17.4	17.8	13.8	21.3	12.8	18.3	7	*I2C*
8	350.0	95.2	82.7	102.6	74.0	88.6	38.9		8.9	14.9	18.1	14.6	18.9	12.0	13.4	8	*L6*
9	350.0	350.0	350.0	76.6	120.7	1931.4	63.5	118.5		9.8	12.5	9.8	13.4	8.9	7.1	9	*Mi*
10	50.0	28.5	57.2	66.0	58.9	75.3	19.3	52.0	350.0		11.6	13.2	16.5	17.1	17.4	10	*N*
11	53.3	104.0	75.3	350.0	75.3	102.7	33.9	350.0	86.6	84.3		14.6	12.3	20.5	15.5	11	*Pib*
12	54.8	38.8	67.5	18.1	47.7	133.8	32.1	95.6	40.7	44.8	86.6		15.6	9.4	19.5	12	*RPM1*
13	93.6	74.0	73.3	99.5	73.3	117.1	28.3	44.6	111.2	86.6	350.0	81.5		18.8	11.5	13	*RPP8*
14	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	97.2	138.6	65.8	109.9	28.0	83.8	350.0		21.4	14	*RPS2*
15	33.3	106.0	1894.4	21.3	350.0	82.7	52.0	86.6	350.0	61.1	350.0	46.8	95.2	102.6		15	*RPS5*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

Divergence

图4 悬钩子蔷薇 RGAs 与已知植物 *R* 基因的 NBS 区域的氨基酸序列相似性比较

Fig. 4 The identity percentage among amino acid sequence of *Rosa rubus* RGAs and NBS region of known plant *R* genes

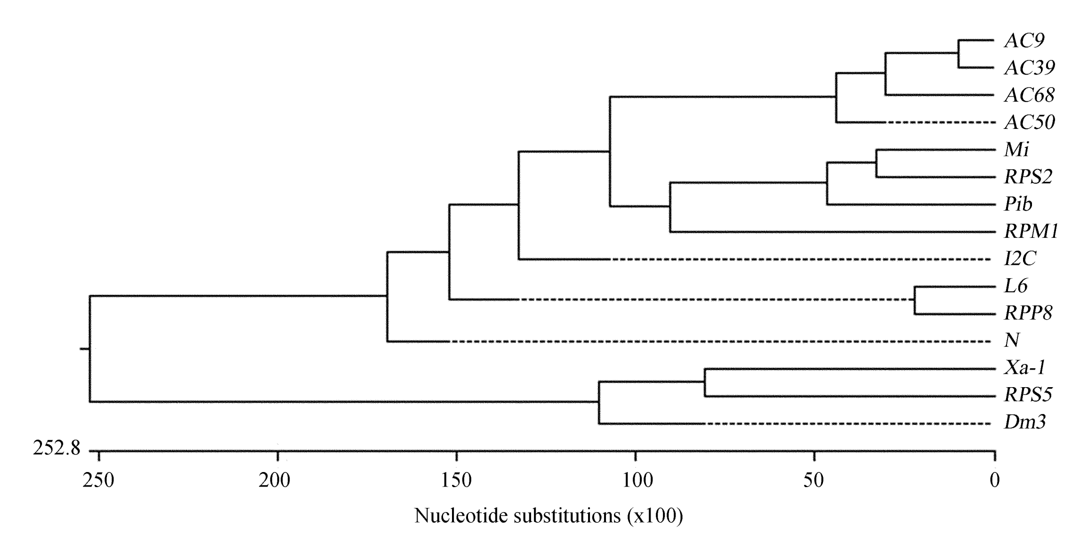


图5 悬钩子蔷薇 RGAs 氨基酸序列与11个已知植物 *R* 基因 NBS 区域的聚类分析结果

Fig. 5 Phylogenic tree based on alignment of the deduced amino acid sequences of *Rosa rubus* RGAs and NBS region of known plant *R* genes

3 讨论

3.1 悬钩子蔷薇 RGAs 的分离与鉴定

RGAs 是个庞大的基因家族，从基因组中分离的部分 RGAs 可能由于内含子的存在，无法通读，为不表达的假基因，而从 cDNA 中分离的 RGAs 则均为表达序列，不含任何内含子，它们为抗病候选基因的可能性更大，本研究从悬钩子蔷薇 cDNA 中扩增分离 RGAs，这将更有利于我们筛选真正的 *R* 基因。

从获得的4条 RGAs 的结构分析表明，这些 RGAs 序列中含 NBS 类 *R* 基因的保守结构域，如 P-loop、Kinase-2、GLPL 等，并且这些序列具有连续的开放阅读框（ORF）。因此，这些 RGAs 序列可能是功能性的 *R* 基因的部分序列，尤其 AC68 与马铃薯抗晚疫病基因 *R3a*（AAW48299）相似性为95%，提示 AC68 很可能是抗晚疫病相

关基因序列。其中获得的部分序列，有的与从栽培月季‘金银岛’和‘香云’中克隆的花香基因、种子储存蛋白、P450 羟基化酶家族基因、或线粒体 *Cox3* 基因等有较高的相似性，说明 NBS 序列与上述基因有一定的进化关系，同时也说明，上述基因在抗病进化过程中起到了一定的作用。

模式植物全基因的测序结果表明，虽然，NBS 结构域是最重要的 *R* 基因保守结构域之一，在植物的抗病反应中起着重要的作用，但是植物 NBS-LRR 类 *R* 基因在植物基因组中广泛存在，而且并非只有 *R* 基因才具有 NBS 结构域，许多蛋白家族，包括 RAS（rat sarcoma）族蛋白、ATPase 延伸因子、G 蛋白都含有 NBS 位点（Baker 等，1997）。另外，NBS 还出现在许多 ATP 和 GTP 的结合蛋白中（Traut，1994）。除了 NBS 结构域，NBS-LRR 类 *R* 基因还应具有其它一些重要的结构域，如 TIR（toll or interluken-1-receptor）、LRR（leucine-rich repeats）或 LZ（leucine zipper）等。所以本研究分离得到的 4 条 NBS 类 RGA，仅为潜在的 *R* 基因片段，其确切的功能还需进一步的分析。

3.2　悬钩子蔷薇 RGAs 的多样性及进化关系分析

目前，已有 200 多条蔷薇属的 RGAs 被分离出来（经 GenBank 查询），将本研究获得的 4 条序列进行相似性比较之后，发现 4 条序列与这 200 多条 RGAs 中的部分序列具有较高的相似性，但没有完全相同的序列，从中表明了蔷薇植物的 NBS 类 R 基因及候选基因为一个庞大的基因家族，可能分属于不同的亚族，表现出丰富的多态性，这暗示了获得具有抗病功能的基因可能性较大。研究表明，在植物基因组中的 RGAs 序列多样性可能是由于不等交换造成的，但造成 RGAs 序列多样性和复杂度的遗传机理直接证据还待进一步研究。

本研究 4 条 RGAs 氨基酸序列相似性比较中（图3），AC39 与 AC68 之间相似性最高（79.2%），AC9 与 AC50 之间相似性最低（14.2%），由此推测，AC39 与 AC68 可能是同一基因的不同拷贝，而 AC9 与 AC50 则可能为趋异起源（divergent origins）。目前关于 *R* 基因进化的遗传机制主要有两个：逐步进化趋异（slowing evolving divergence）假说和快速进化过程（rapidly evolving process）（Xu 等，2005），本研究结果为这两个遗传机制提供了一些佐证。通过对 4 条序列的比对分析表明，在保守结构域之间存在许多点突变，小片段的插入或缺失事件，它们是悬钩子蔷薇植物 RGAs 趋异的源泉，这表明，在悬钩子蔷薇中，NBS 类 *R* 基因的进化是逐步进化趋异，而不是快速进化过程，这与前人关于 *R* 基因进化的研究结果相近（Pan 等，2000；Yuksel 等，2005；陈观水等，2006）。

3.3　悬钩子蔷薇 RGAs 分离的意义

R 基因的获得是进行抗病育种的基础，发掘 *R* 基因资源是提高植物抗病性、防治病害的关键。常规育种手段在许多病害育种中存在一定困难，将克隆的 *R* 基因应用于抗病育种、具有高效、安全和广谱的优点，很有应用前景。悬钩子蔷薇利用的目的是将其优良的目标性状基因导入到栽培月季中，扩大栽培月季的遗传基础，选育出具有优良抗逆抗病能力的月季新品种。本研究中悬钩子蔷薇的 4 条 RGAs 克隆，为进一步通过分子生物学和遗传学手段对这些抗病相关基因片段进行全长克隆、功能分析和染色体定位等工作奠定了基础。

〔参　考　文　献〕

白锦荣，2009. 部分蔷薇属种质资源亲缘关系分析及抗白粉病育种［D］. 北京：北京林业大学（博士论文）

李卉，2010. 月季抗白粉病育种初步研究［D］. 北京：北京林业大学（硕士论文）

张佐双，朱秀珍，2006. 中国月季［M］. 北京：中国林业出版社

Bai JR（白锦荣），Zhang QX（张启翔），Pan HT（潘会堂），2009. Investigation on germplasm resources of the genus *Rosa* L. in Northwest Yunnan［J］. *Journal of Plant Genetic Resources*（植物遗传资源学报），**10**（2）：218—223

Baker B，Zambryski P，Staskawicz B *et al.*，1997. Signaling in plant-microbe interaction［J］. *Science*，**276**（2）：726—733

Byrne DH，Black W，Ma Y *et al.*，1995. The use of amphidiploidy in the development of blackspot resistant rose germplasm［J］. *Acta Horticulturae*，**424**：269—272

Chen GS（陈观水），Zhou YF（周以飞），Lin S（林生）*et al.*，2006. Isolation and sequence analysis of NBS-type in sweet potato（*Ipomoea batatas*（L.）Lam）［J］. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*（热带亚热带植物学报），**14**（5）：359—365

Ellis J, Jones D, 1998. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, **1** (4): 288—293

Gao LH (高丽华), Zhou YF (周以飞), Zheng WW (郑伟文), 2007. Cloning and analysis of NBS class resistance gene analogues in Squash (*Cucurbita moschata* Duch.) [J]. *Journal of Changjiang Vegetables* (长江蔬菜), (8): 40—43

Hammond-Kosack KE, Jone JDG, 1997. Plant resistance gene [J]. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 575—607

Hulbert SH, Webb CA, Smith SM *et al*., 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization [J]. *Annual Review of Phytopathology*, **39**: 285—312

Liu Y (刘宇), Yan CX (闫彩霞), Zhang YT (张廷婷) *et al*., 2010. Cloning and prokaryotic expression of peanut NBS-LRR resistant gene [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology* (中国农业科技导报), **12** (3): 73—78

Liu YG (刘永刚), Liu QL (刘青林), 2004. Evaluation and exploitation of genetic resources in roses [J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), **5** (1): 87—90

Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW *et al*., 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily [J]. *The Plant Journal*, **20**: 317—332

Pan Q, Wendel J, Fluhr R, 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, **50** (3): 203—213

Speulman E, Bouchez D, Holub EB *et al*., 1998. Disease resistance gene homlogs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, **14** (4): 467—474

Tang KX (唐开学), Qiu XQ (邱显钦), Zhang H (张颢) *et al*., 2008. Study on genetic diversity of some *Rosa* L. germplasm in Yunnan based on SSR markers [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **35** (8): 1227—1232

Traut TW, 1994. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding-sites [J]. *European Journal of Biochemistry*, **222** (1): 9—19

William VM, 1999. Plant nematode resistance genes [J]. *Current Opinion Plant Biology*, **2** (4): 327—331

Xu Q, Wen XP, Deng XX, 2005. Isolation of TIR and TIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **111** (5): 819—830

Yuksel B, Estill JC, Schulze SR *et al*., 2005. Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, **274** (3): 248—263

Zhang XP (张喜萍), Xu XH (许修宏), Gong SF (龚束芳), 2002. Selection of rose varieties to resistance of powdery mildew [J]. *Journal of Northeast Forestry University* (东北林业大学学报), **30** (6): 93—94

Zhang YK (章银柯), Jiang Y (江燕), Zhu W (朱炜), 2009. Resources of *Rosa* in China and its prospect of landscaping application [J]. *Seed* (种子), **28** (8): 68—70